適切な注入方式と洗浄液の選択によるHILICモード クロマトグラフィーの改善

Carmen Santasania
carmen.santasania@sial.com

HILICについて

水系の順相(ANP)としても知られるHILICクロマトグラフィーは、ベア シリカ、シアノ、アミノ、フェニル、ペンタフルオロフェニル(PFP)、ジオールなどの高極性固定相と、比較的無極性の移動相を用います。移動相は、通常高い割合の有機溶媒で構成され、水や調整用バッファー溶液から成ります。HILICモードを用いる典型的な分析対象物は、塩基性アミン(極性、無極性)、高極性酸性化合物、高極性中性化合物です。HILICモードとは、高極性固定相の表面に選択的に移動相中の水が吸着して水和層が形成され、残りの移動相は有機溶媒リッチな有機層となり、この二層間での液液分配の機構となります。分析対象物はこの二層間で分配されます。高極性な溶質は固定相に近い水和層に分配され、より極性の低い溶質よりも長く保持されます。HILICモードは、他にも、固定相表面と直接水素結合やイオン交換が生じます。

分析者が知っておかなければならない多くの操作上の注意点があります。

HILICは、高極性化合物の強い保持、および、HILICクロマトグラフィーの逆相とは異なる選択性により、近年人気を増しています。さらに、HILICモードは移動相の高揮発性により、質量分析検出(MS)や蒸発光散乱検出(ELSD)と高い互換性を持ちます。また、HILICは高揮発性の移動相からの目的化合物の回収が相対的に容易であることから、分取クロマトグラフィーでの使用に有利です。さらに、移動相の粘性が低いため、より速い流速を用いることが可能です。試料前処理の点では、固相抽出(SPE)における有機溶媒リッチな溶出液は、乾固および溶媒置換の操作を行うことなく直接HPLCに注入することができます。最後に、HILICは代謝物の分離に役立ちます。化合物は代謝されるとともにより極性が高くなるため、逆相による保持は困難です。HILICはこれらの高極性代謝物をより強く保持し、容易な分離および定性が可能となります。

HILICクロマトグラフィーを逆逆相と見なしてしまう事があるため、HILICクロマトグラフィーを用いる前に、分析者が知っておくべき多くの操作上の注意点があります。本報告では、オートサンプラーの針洗浄液がどのようにクロマトグラフィーに悪影響を及ぼすかを説明します。

結果および考察

Figure 1は、Ascentis® Express HILIC HPLCカラムで得られる典型的なQAクロマトグラムを示します。Figure 2は、Waters® Acquity UPLC®装置上での新品未使用時のAscentis Express HILICカラムから得られたクロマトグラムです。Figure 1で得られた結果との差異にご注目ください。強溶剤(水)での洗浄、エンドフリッツの検査、別の装置での試験、逆方向から流しての試験、試料注入溶剤の変更、より大きな直径カラム(I.D.4.6mm)での試験など、問題を解決するためにいくつかの試みを行いました。しかし、いずれの試みも問題を解決しませんでした。

不十分なクロマトグラフィーをトラブルシュートするなかで、装置取扱説明書に装置にはいくつかの注入モードがあることが示されていました。

Conditions for Figures 1-3

column:	Ascentis Express Silica, 10 cm x 2.1 mm I.D., 2.7 µm particles (53930-U)
mobile phase:	10:90, (A) 100 mM ammonium formate, pH 3.0 with concentrated formic acid (B) acetonitrile
temperature:	35 °C
flow rate:	0.4 mL/min.
detection:	UV at 254 nm
injection volume:	1 µL
	1. Acenaphthene, 80 mg/mL in mobile phase
	2. Adenosine, 35 mg/mL in mobile phase
	3. Cytosine, 75 mg/mL in mobile phase

Figure 1. Typical QA Chromatogram for Ascentis Express HILIC Column

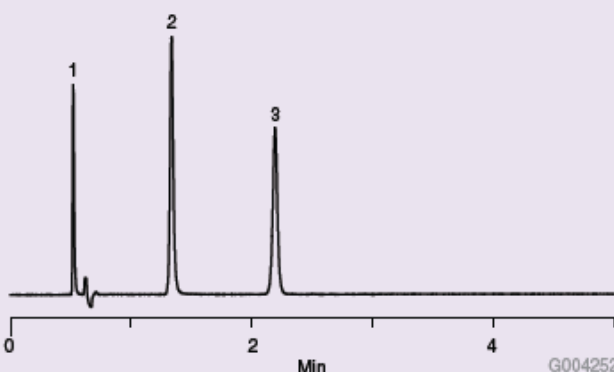



Figure 2. Chromatogram from First Injection on a New Column (wrong technique)

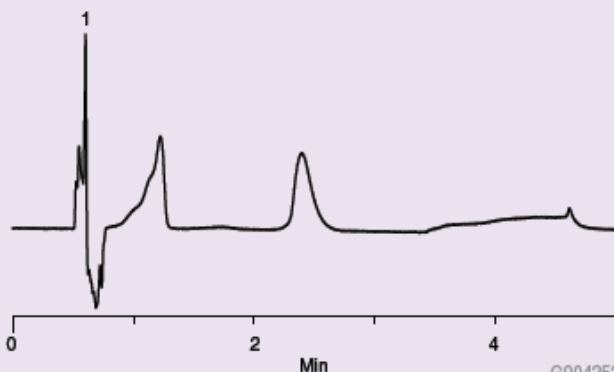
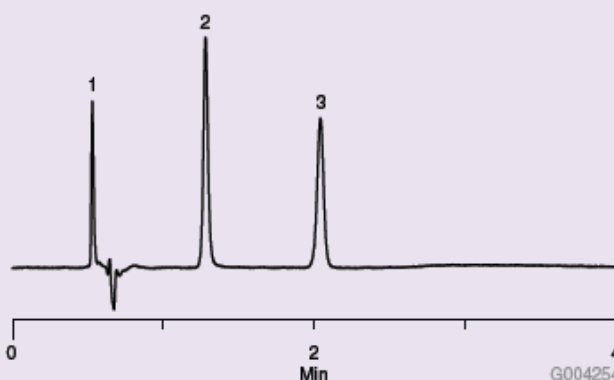



Figure 3. Chromatogram After Switching Wash Solvent Bottles Between Weak and Strong Solvents

Partial loop modeが装置の初期設定であったため、Figure 2のクロマトグラムはこれを用いて得られたものです。取扱説明書(1)によると、Partial loop modeのみが、カラム上に試料および弱溶剤の洗浄液を注入する唯一の注入法であることが分かりました。Partial loop modeは、逆相モードでの試料注入には最適な方法です。しかしながら、HILICモードにおいては、溶剤と試料の極性は逆相モードとは真逆となります。

Acquity UPLC®装置には、強溶剤と弱溶剤の2種類の洗浄液があります。デフォルトでは、強溶剤洗浄液は10:90 / water:acetonitrileであり、弱溶剤洗浄液は90:10 / water:acetonitrileです。装置は、試料と共に小容量の弱溶剤洗浄液（90:10 / water:acetonitrile）を注入していました。HILICモードにおいては、この洗浄液は強溶剤となります。

洗浄液によって不十分なクロマトグラフィーが引き起こされていたかを検証するため、針洗浄液ボトルを逆に配置しました。このように針洗浄液の溶剤強度を変更したのち注入した結果がFigure 3のクロマトグラムであり、針の洗浄液の極性が不十分なクロマトグラフィーの原因であったことが示唆されました。

洗浄液が不十分なクロマトグラフィーの原因であったかどうかを決定付けるために、針洗浄液ボトルの位置をデフォルトの配置に戻し、再度注入を試みました。結果として得られたクロマトグラムは、Figure 2と類似しており、再び不十分なクロマトグラフィーとなってしまうことが示されました。洗浄液の極性の検討に加えて、UPLCの他の注入方法についても検討を行いました。注入モードの変更とさらにオリジナルの洗浄液を使用することによって、Figure 3と類似したクロマトグラフィーを得ました。

結論

針洗浄液の極性はHILICクロマトグラフィーにおいて重大な役割を果たすことが示されました。加えて、注入方法も、良いクロマトグラフィーを得る際には重要でした。本研究の初めでは、カラムが悪いのではないかという疑いがありました。研究の結果、針洗浄液および試料注入方式が、HILICモードという選択性の異なるクロマトグラフィーにおいて良いクロマトグラムを得る際には重要であることが分かりました。

HILICクロマトグラフィーを使用する場合、特に逆相モードでLCを使用した後に用いる際は、カラム性能を十分に発揮できるようにLCの設定がHILICモードに適切な針洗浄液、試料注入方式、試料溶媒となっているかを確認することが重要です。

Reference

1. Waters On-Line Help: Selecting an Acquity Injection Technique.

SIGMA-ALDRICH®
シグマ アルドリッチ ジャパン

〒140-0002 東京都品川区東品川2-2-24 天王洲セントラルタワー4階
製品に関するお問い合わせは、弊社アナリティカル製品グループへ
TEL：03-5796-7440 FAX：03-5796-7355
E-mail：sialjpsp@sial.com
在庫照会・ご注文方法に関するお問い合わせは、弊社カスタマーサービスへ
TEL：03-5796-7320 FAX：03-5796-7325
E-mail：sialjpcs@sial.com
大阪営業所：〒532-0004 大阪市淀川区西宮原2-7-38 新大阪西浦ビル
TEL：06-6397-5963 FAX：06-6397-4649
http://www.sigma-aldrich.com/japan

お問合せは下記代理店へ